

München, 1960.

Tierexperimentelle Untersuchungen
bei Verabreichung von
2-(β -Chloräthyl)-2,3-dihydro-4-oxo-
(benzo-1,3-oxazin)

vorgelegt von

MARIA SCHWANK

aus Karlsruhe

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Tierexperimentelle Untersuchungen bei Verabreichung von
2-(8-Chloräthyl)-2,3-dihydro-4-oxo-(benzo-1,3-oxazin)

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Maria Schwank
aus Karlsruhe

1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. H. Schwegel

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 2. 1960

Inhaltsverzeichnis

Seite

Problematik	2
Eigene Untersuchungen	2
Methodik	2
Versuchsreihen	4
Statistische Auswertung	9
Diskussion	24
Zusammenfassung	27
Literaturverzeichnis	28



Problematik

Im Rahmen größerer Versuchsreihen über den Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Substanzen wurde von MATHIES und v. WERTHER¹⁾, sowie GERSON²⁾, nachgewiesen, daß 2-(β -Chloräthyl)-2,3-dihydro-4-oxo-(benzo-1,3-oxazin), (chemische Kurzbezeichnung: Chloraethylbenzmethoxazon, Versuchsbezeichnung: Ap 67) eine statistisch faßbare Hyaluronidasehemmung bewirkt. Diese Versuche wurden mit einmaliger, intraperitonealer Applikation von 0,02 g/100 g Tier durchgeführt. Weitere Versuche zeigten, daß diese Wirkung als Nebennierenmarkstimulierung mit Ausscheidung von Nebennierenkatecholaminen aufzufassen ist (MATHIES und v. WERTHER¹⁾, GERSON²⁾). In den hier vorgelegten Versuchen sollten die Verhältnisse geklärt werden, die bei längerer Applikation der genannten Substanz und nach Absetzen des Medikamentes vorliegen. Um den therapeutischen Gegebenheiten der oralen Applikation näherzukommen, wurde in diesen Versuchsreihen das Chloraethylbenzmethoxazon durch die Schlundsonde verabreicht. Die enterale Resorption der Substanz wurde von BEISENHERZ u. Mitarb.³⁾ nachgewiesen. Im Urin findet man innerhalb von 33 Stunden $\frac{3}{4}$ der oral verabreichten Menge als Gesamtsalizylat und Gesamtgentisat wieder (BEISENHERZ u. Mitarb.³⁾).

Eigene Versuche

Methodik

Es wurden männliche, weiße Ratten (Wistar-Böcke) verwendet, die bei Versuchsbeginn 110-180 g wogen. Die Tiere wurden bei der Be-

stimmung der Hyaluronidaseaktivität mit Evipan narkotisiert (30 mg Evipan-Natrium pro 100 g Ratte). Nach WILHELM⁴⁾ besteht keine Beeinflussung der Hyaluronidasehemmung durch Barbiturate. Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung einer reinen Farbstoffquaddel (F_0, F_1 bzw. F_2) und einer Farbstoff+Hyaluronidasequaddel (FH_0, FH_1 bzw. FH_2) ermittelt. Die Bauchhaut der Tiere wurde vorher mit Pilka enthaart. Von einer 0,6 %igen Evansblaulösung wurden 0,1 ccm als reine Farbstoffquaddel intrakutan injiziert. Diese Farbstoffquaddeln wurden zur Ermittlung des experimentellen Fehlers jeweils doppelt gesetzt (der Mittelwert beider Quaddeln wurde mit F_{M0}, F_{M1} bzw. F_{M2} angegeben). Für die Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln benutzten wir eine Lösung von 150 I.E. Hyaluronidase (Kinetin) in 2 ccm der oben beschriebenen Evansblaulösung. Auch von dieser Farbstoff + Hyaluronidase-lösung wurden gleichzeitig zweimal je 0,1 ccm mit einer dünnen Kanüle streng intrakutan injiziert (die Mittelwerte wurden entsprechend mit FH_{M0}, FH_{M1} bzw. FH_{M2} angegeben). In einer Quaddel kamen also 7,5 I.E. Hyaluronidase zur Wirkung. 10 Minuten nach jeder der 4 Injektionen wurde die Ausbreitung festgelegt und auf Zelluloidstreifen übertragen. Die Flächeninhalte wurden später planimetrisch bestimmt und sind in mm^2 angegeben. Die Ausbreitung verläuft nach MADINAVEITIA⁵⁾ zweiphasisch und nur die Reaktion innerhalb der ersten 10 Minuten ist als echter Effekt der Hyaluronidase gesichert. Nach GIBIAN⁶⁾ beruht die aktive Diffusion einer intrakutan gesetzten Quaddel auf dem Druck, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Hyaluronidase setzt den Widerstand des umgebenden Gewebes gegenüber den Druck der Quaddel herab.

Chloraethylbenzmethoxazon wurde 3-%ig in Oxymethylcellulose emulgiert (15 g in 500 ccm einer 1,0%igen Oxymethylcellulose-lösung). 1 ccm der Emulsion enthielt also 0,03 g Chloraethylbenzmethoxazon. Diese Dosis wurde täglich einmal pro 100 g Tier durch eine Schlundsonde verabreicht. Dem Gewicht des Tieres entsprechend wurden also täglich etwa 0,03 bis 0,12 g Chloraethylbenzmethoxazon pro Tier gegeben. Zur Einführung der Schlundsonde wurden die Tiere möglichst kurzfristig mit Äther narkotisiert.

I. Versuchsreihe (Leerversuch)

Bei Versuchsbeginn wurden 12 Ratten (125-160 g schwer) in Evipan-Narkose gequaddelt (F_0, FH_0). In der folgenden Zeit wurden sie ohne irgendeine Behandlung medikamentöser Art gehalten. Sowohl nach 4 (F_1, FH_1) als auch nach 8 Wochen (F_2, FH_2) wurde bei ihnen nochmals die Hyaluronidaseaktivität durch zwei Farbstoff- und zwei Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln bestimmt. Die Werte blieben unverändert (s. Tab. 1, 4, 5 und Abb. 3).

2. Versuchsreihe

Vor Beginn der Medikation wurde bei 16 Ratten, deren Gewicht zwischen 110 und 170 g lag, die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel (F_0) und die Ausbreitung der Farbstoff + Hyaluronidasequaddel (FH_0) bestimmt. Zur Ermittlung des experimentellen Fehlers wurden wie bei Versuchsreihe 1 an jedem Tier je 2 Quaddeln der beiden Typen simultan gesetzt. Chloraethylbenzmethoxazon wurde in den folgenden 4 Wochen täglich durch die Schlundsonde in Äthernarkose verabreicht. Um die Tagesdosis der Gewichtszunahme anpassen zu können, wurden die Ratten in Abständen von 2 Wochen

Tabelle 1 (Versuchsreihe 1)

Tier Nr.	Versuchsbeginn				4 Wochen nach Vers. Beginn				8 Wochen nach Versuchsbeginn				Gew.			
	Tier- Gew.	F ₀	F _{Mo}	FH ₀	FH _{Mo}	F ₁	F _{M1}	FH ₁	FH _{M1}	He ₁ %	F ₂	F _{M2}		FH ₂	FH _{M2}	He ₂ %
1	130	131 139	135	256 260	258	145 135	140	261 251	256	1,67	150 133	112	260 251	256	1,67	240
3	140	138 130	134	246 242	244	135 127	131	253 245	249	-4,5	137 134	136	240 233	237	6,40	245
4	150	131 140	136	258 263	261	138 130	134	250 253	252	7,2	134 140	138	255 251	253	6,40	330
5	150	125 134	129	331 222	227	130 130	130	235 227	231	-4,08	133 129	131	230 239	235	-8,16	260
6	150	127 130	129	235 229	232	128 138	133	236 244	240	-7,77	134 130	132	236 227	232	0,00	305
7	160	139 136	138	254 252	253	138 138	138	249 239	244	7,83	146 137	142	243 250	247	5,22	330
8	150	124 119	122	220 228	224	128 130	129	228 235	232	-7,84	128 123	126	231 221	226	-1,96	240
9	140	143 139	141	245 240	243	136 133	135	237 241	239	6,67	140 144	142	239 241	240	5,71	230
10	125	156 158	157	258 264	261	149 148	149	260 266	263	-1,92	146 138	142	262 258	260	0,96	285
11	145	157 148	153	267 268	268	146 147	147	254 259	257	9,56	153 152	153	270 261	266	1,74	265
12	155	120 127	124	220 —	220	122 129	126	213 208	211	9,31	127 128	128	220 229	225	-5,20	260
13	135	140 138	139	253 250	252	132 130	131	250 268	259	-6,20	135 139	137	254 244	249	2,65	250

(Unbehandelte Kontrolltiere)

gewogen. Während der Evipan-Narkose und der 4-wöchigen Fütterungszeit starben 5 Tiere, so daß nur die Ergebnisse von 11 Tieren ausgewertet werden konnten. Nach 4-wöchiger Fütterung mit Chloraethylbenzmethoxazon wurden erneut Farbstoff (F_1)- und Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln (FH_1) gesetzt. Bei den restlichen 11 Ratten zeigte sich eine mittlere Hyaluronidasehemmung von 51,5 %. Nach 6 behandlungsfreien Wochen wurden die Tiere nochmals gequaddelt (F_2, FH_2). Die Hyaluronidasehemmung, berechnet aus den mittleren Quaddelgrößen aller Tiere, betrug jetzt 19,3 %. Bei Versuchsende wogen die Ratten 200 - 360 g (s. Tab. 2 und 8, sowie Abb. 1 und 2 - 3).

3. Versuchsreihe

13 Tiere, 120 bis 160 g schwer, wurden zuerst unbehandelt gequaddelt (F_0, FH_0). Auch diesen Tieren wurde 4 Wochen lang mit der Schlundsonde in Äthernarkose Chloraethylbenzmethoxazon gegeben, und zwar die gleiche Tagesdosis wie bei Versuchsreihe 2. Hier starben 7 Tiere innerhalb der ersten Zeit, es konnten also die Ergebnisse von 6 Tieren ausgewertet werden. Nach 4-wöchiger Fütterung wurden an einem fütterungsfreien Tag wieder je zwei Farbstoff- (F_1) und zwei Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln (FH_1) gesetzt. Aus den Mittelwerten aller Tiere dieser Versuchsreihe ergab sich hier eine mittlere Hyaluronidasehemmung (He_M) von 40,2 % (Tabl. 9). Die Tiere wurden nun über weitere 9 Wochen hinweg täglich mit Chloraethylbenzmethoxazon gefüttert. Bei der letzten Bestimmung der Farbstoff- und der Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln (F_2, FH_2) nach insgesamt 13 Wochen Fütterung ergab sich ein Abfall der mittleren Hyaluronidasehemmung

Tier Nr.	Versuchs- Tier- Gew.			s u c h s b e g i n n			4 Wochen n. Vers.-Beginn				10 Wochen nach Versuchsbeginn					Gew.
	F_0	F_{Mo}	F_{Ho}	F_{Ho}	F_{Ho}	F_{Ho}	F_1	F_{M1}	F_{H1}	F_{H1}	F_2	F_{M2}	F_{H2}	F_{H2}	He_2	
130	135	151 140	146	190 210	200		132 140	136	192 197	195	130 124	127	213 202	208	-14,8	370
128	110	133 113	123	215 229	222		126 125	126	200 185	193	120 123	122	242 228	235	- 7,1	200
142	125	140 144	142	242 252	247		120 132	126	185 146	166	157 160	159	254 265	260	-11,4	290
137	130	121 124	123	245 260	253		148 142	145	183 201	192	121 129	125	216 208	212	30,8	280
140	140	109 123	116	239 250	245		96 114	105	167 168	168	125 145	135	190 215	203	32,8	320
150	120	154 136	145	240 228	234		128 130	129	142 148	145	133 130	132	211 219	215	21,3	340
127	120	155 154	155	249 242	246		141 145	143	162 173	168	132 132	132	185 209	197	31,5	280
151	170	154 146	150	240 243	242		114 107	111	200 199	200	135 149	142	217 225	221	22,0	360
148	150	138 145	142	231 200	216		143 157	150	197 183	190	146 150	148	217 213	215	0	320
138	130	130 118	124	237 230	234		146 157	152	210 220	215	135 125	130	213 187	200	30,3	250
120	170	133 119	126	253 261	257		125 141	133	190 189	190	150 142	146	216 210	213	33,6	280

Tier Nr.	Tier- Gew.	V e r s u c h s b e g i n n				4 Wochen n. Vers. Beginn				He ₁ %	13 Wochen nach Versuchsbeginn				Gew.
		F ₀	F _{Mo}	FH ₀	FH _{Mo}	F ₁	F _{M1}	FH ₁	FH _{M1}		F ₂	F _{M2}	FH ₂	FH _{M2}	
112	160	122 121	122	236	236	105 117	111	180 202	191	39,1	133 137	135	227 217	222	12,2 230
110	160	115 129	122	210 226	218	138 146	142	201 207	204	14,4	144 123	134	187 206	197	22,9 290
134	130	128 120	124	199 207	203	160 155	158	160 178	169	43,1	131 127	129	207 220	214	-12,6 250
113	145	129 120	125	214 250	232	130 139	135	203 232	218	13,9	146 132	139	204 190	197	32,4 240
119	160	138 110	124	220 233	227	121 125	123	182 190	186	39,2	133 121	127	125 190	208	18,6 270
144	120	154 156	155	280 292	286	150 160	155	182 198	190	73,2	133 148	141	226 205	216	54,2 250

13 Wochen Fütterung mit Ap 67

(He_M) auf 24,4 %. Die Gewichte der Ratten lagen bei Versuchsende zwischen 230 und 290 g. (s. Tab. 3 und 9, sowie Abb. 2 und 3).

Berechnung und statistische Auswertung

Bei der Berechnung der prozentualen Hyaluronidasehemmung des Einzeltieres wurde die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel vor Versuchsbeginn einer 100 %igen Hemmung (eine Farbstoff + Hyaluronidasequaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität hätte die gleiche Größe), dagegen die Farbstoff + Hyaluronidasequaddel vor Versuchsbeginn einer 0 %igen Hemmung gleichgesetzt. Ausgehend von diesen Festpunkten läßt sich die Hemmung unter oder nach Applikation von Chloräthylbenzmethoxazon aus den Flächeninhalten der gehemmten Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln errechnen. Die prozentuale Hemmung der Einzeltiere ist in Tab. 1, 2 und 3 jeweils mit He_1 bzw. He_2 angegeben.

Außerdem wurde eine mittlere Hyaluronidasehemmung (He_M) in den Versuchsreihen 2 und 3 ermittelt. Dieser Wert wurde aus allen Farbstoff- bzw. Farbstoff + Hyaluronidase-Mittelwerten (F_{Mo} bzw. FH_{Mo} , FH_{M1} , FH_{M2}) berechnet. (s. Tab. 8, 9, Abb. 1, 2). Die mittleren Flächeninhalte, welche zugrundegelegt sind, wurden in Abb. 3 graphisch dargestellt.

Versuchsreihe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Ziel der statistischen Analyse war es zu prüfen, ob die Ausbreitung beider Quaddeltypen über den gesamten Zeitraum des Versuches hinweg als konstant angesehen werden kann. Der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde ein entsprechendes lineares

Modell zugrunde gelegt, wie es auch bei der Auswertung des Versuches über die Hyaluronidasehemmung bei Medikation zur Anwendung gelangte. Es war jedoch in diesem Fall nicht notwendig, die Farbstoff-Quaddel und die Farbstoff + Hyaluronidase-quaddel getrennt zu behandeln, da die Prüfhypothese impliziert, daß die beiden Quaddeltypen sich vollkommen gleichartig verhalten.

Entsprechend dem zugrundegelegten linearen Modell erfolgte die Auswertung mittels einer mehrfachen Varianz-Analyse. Die hierbei ermittelten Varianz-Komponenten der Gesamt-Varianz, sowie die Zahl der ihnen zukommenden Freiheitsgrade sind in Tab. 4 in der üblichen Form zusammengestellt. Die Ergebnisse der Varianz-Analyse sind wie folgt zu interpretieren:

- a) Der Mittelwert von 2 zusammengehörigen Einzelbestimmungen ist mit einem mittleren Fehler behaftet, der sich aus der Varianz zwischen diesen beiden Einzelbestimmungen schätzen läßt. Eine genauere Schätzung dieses mittleren Fehlers erhält man, wenn man alle 72 Doppelbestimmungen berücksichtigt und annimmt, daß der mittlere Fehler innerhalb aller Doppelbestimmungen gleich ist. Eine unabhängig von der Varianz-Analyse durchgeführte Prüfung dieser Annahme mittels des Tests von BARTLETT ergab, daß die Meßergebnisse dieser Annahme nicht widersprechen (s.unten). Die in der Varianz-Analyse angegebenen "Varianz-innerhalb der Doppelbestimmungen" stellt somit die beste, aus den Versuchsergebnissen zu gewinnende Schätzung der Varianz zwischen zusammengehörigen Einzelbestimmungen dar. Aus ihr ergibt sich als mittlerer Fehler des Mittelwertes $\bar{x}$ einer Doppelbestimmung der Wert $\pm 3.5 \text{ mm}^2$. Als Vertrauensintervall von $\bar{x}$ folgt hieraus $\bar{x} \pm 7.05 \text{ mm}^2$.

- b) Die Abweichung der empirischen Ergebnisse von den Hypothesen, die dem linearen Modell zugrunde liegen, drücken sich in der Varianz-Analyse in den Wechselwirkungen "Tiere - Zeiten", "Tiere - Quaddeltypen", Zeiten - Quaddeltypen" und der "Rest-Varianz" aus. Der Vergleich dieser Wechselwirkungen mit dem experimentellen Fehler (Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen) nach dem Varianz-Quotienten-Test, ergibt nur für die Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen einen Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$, dessen Größe nicht mehr als zufallsbedingt angesehen werden kann. (Überschreitungswahrscheinlichkeit $p = 0,1 \%$). Die Änderungen, welche die Quaddeln von einem Bestimmungszeitpunkt zum anderen erfahren, können somit als unabhängig vom Versuchstier und vom Typus der Quaddel angesehen werden. Dagegen ist der Unterschied zwischen den beiden Quaddel-Typen wesentlich von dem jeweiligen Versuchstier abhängig. (s. unten unter d.)
- c) Die mittlere Änderung, welche die Größe der Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen erfährt, und die wie oben bemerkt, von den Versuchstieren und dem Typus der Quaddeln unabhängig ist, drückt sich in der "Varianz zwischen den Zeiten" aus. Diese ist zahlenmäßig wesentlich kleiner als der experimentelle Fehler, d.h. die Änderungen der Quaddelgrößen im Verlaufe des Versuches liegen vollkommen in dem Bereich des experimentellen Fehlers. Die vorliegenden Versuche berechtigen somit zu dem Schluß, daß sich im Verlaufe des Beobachtungszeitraums die Diffusionsgeschwindigkeit weder bei der Farbstoff noch bei der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel geändert haben.

Zur Beurteilung dieses Ergebnisses ist es vielleicht von Bedeutung zu bemerken, daß in dem gleichen Zeitraum die Tiere eine wesentliche Gewichtszunahme erfahren haben, deren Betrag im Mittel 132 ± 5.6 gr betrug.

- d) Die gesicherte Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen bringt zum Ausdruck, daß der Unterschied zwischen der Größe der Farbstoff und der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vom Versuchstier abhängig ist. Eine orientierende Untersuchung dieses Sachverhaltes durch Berechnung der Regression zwischen Farbstoff-Quaddeln und den Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln zeigte, daß der Unterschied zwischen den beiden Quaddel-Typen annähernd linear mit der Größe der Farbstoff-Quaddel wächst. Eine eingehende Untersuchung wurde an dieser Stelle wegen des für diese Frage geringen Stichprobenumfanges unterlassen, und soll später, bei Vorliegen weiterer Beobachtungen, vorgenommen werden.

In Tabelle 5 ist für jeden Bestimmungszeitpunkt der Mittelwert $\bar{x}$, die Varianz s^2 zwischen zusammengehörige Einzelmessungen und der sich hieraus ergebende mittlere Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes einer Doppelbestimmung angegeben. Der Vergleich der Varianzen s^2 mittels des BARTLETT-Tests ergab bei $n = 5$ Freiheitsgraden einen Wert $\chi^2_{\text{emp}} = 3.035$, dem eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von höchstens 50 % zukommt. Die Varianzen s^2 , welche die Größe des experimentellen Fehlers zum Ausdruck bringen, können daher als vom Zeitpunkt ihrer Bestimmung und vom Typus der Quaddeln unabhängig angesehen werden (s. auch oben unter a)

Art der Varians	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	11	11.420	1.038		0.1 %
Zwischen den Zeiten	2	4	2		-
Zwischen den Quaddeln-Typen	1	434.501	434.501		0.1 %
Tiere - Zeiten	22	890	40	1.60	-
Tiere - Quaddeln-Typen	11	1.499	136	5.44	0.1 %
Zeiten - Quaddeln-Typen	2	96	48	1.92	-
Rest-Varianz	22	565	26	1.00	-
Zwischen Doppelbestimmung	71	448.975	6.324		
Innerhalb Doppelbestimmung	72	1.802	25		
Gesamt-Varianz	143	450.777	3.152		

T a b e l l e 4

(Versuchsreihe 1)

	N	$\bar{x}$	s^2	$s\bar{x}$
F ₀	12	136	18.4	1.24
FH ₀	12	247	16.4	1.17
F ₁	12	135	19.8	1.28
FH ₁	12	247	36.1	1.73
F ₂	12	137	29.2	1.56
FH ₂	12	245	30.1	1.58

T a b e l l e 5

(Versuchsreihe 2)

Versuchsreihe 2 und 3 (Versuche mit Chloräthylbenzmethoxazon)

Bei der statistischen Analyse war zu prüfen, ob es berechtigt ist anzunehmen, daß die reine Farbstoffquaddel durch die Medikation keine Änderung erfährt. Außerdem war zu untersuchen, inwieweit die Änderungen der Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen als Folge der Medikation angesehen werden können.

Entsprechend dieser doppelten Fragestellung wurde für jede der beiden Tiergruppen das Verhalten der Farbstoff-Quaddeln und dasjenige der Farbstoff + Hyaluronidasequaddel getrennt untersucht. Das der Auswertung zugrunde liegende statistische Modell war jedoch in beiden Fällen das gleiche. Es wurde angenommen, daß die Änderung, die ein Quaddeltypus von einem Zeitpunkt zum anderen erfährt, für alle Tiere den gleichen Betrag besitzt, das heißt, daß sich die Quaddeln des gleichen Typus verschiedener Tiere um einen, vom Zeitpunkt der Bestimmung unabhängigen, konstanten Betrag unterscheiden. Das zugrunde liegende Modell ist somit ein sogenanntes "lineares Modell". Die statistische Auswertung selber erfolgte mittels mehrfacher Varianzanalysen. Die hierbei ermittelten Varianz-Komponenten sind für die Gruppe 2 in der Tab. 6, für die Gruppe 3 in Tab. 8 angegeben, wobei jeweils eine Varianz-Analyse für die reine Farbstoff-Quaddel und eine solche für die Farbstoff+ Hyaluronidasequaddel aufgeführt ist. In den Schemata bedeutet n die Zahl der Freiheitsgrade, SAQ das Summenabstandsquadrat und MAQ das mittlere Abstandsquadrat (Varianz).

Die Varianz zwischen den beiden, zu einer Doppelbestimmung gehörigen Einzelbestimmungen wurde zur Schätzung des experimentellen Fehlers herangezogen. Unter der Voraussetzung, daß der experimentelle Fehler über die gesamte Versuchsdauer hinweg konstant ist, erhält man eine genauere Schätzung dieser Varianz, wenn man sämtliche Doppelbestimmungen des Gesamtversuches berücksichtigt. Diese Varianz ist in den Varianz-Analysen als "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" angegeben. Als mittlerer Fehler des Mittelwertes einer einzelnen Doppelbestimmung errechnet sich hieraus:

Farbstoff-Quaddel:

Gruppe 2 $\pm$ 5,3 mm²

Gruppe 3 $\pm$ 6,0 mm²

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel:

Gruppe 2 $\pm$ 7,5 mm²

Gruppe 3 $\pm$ 9,5 mm²

In beiden Tiergruppen ist die "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" bei den Farbstoff + Hyaluronidasequaddeln statistisch wesentlich größer als diejenige bei den reinen Farbstoffquaddeln. Der Varianz-Quotient zwischen den beiden Varianzen hat bei beiden Tiergruppen einen Wert, dessen Überschreitungswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ist. Es darf vermutet werden, daß dies auf die biologische Komponente des experimentellen Fehlers zurückzuführen ist, da die experimentelle Technik bei beiden Quaddel-Typen die gleiche ist.

Der experimentelle Fehler kann nicht zur Beurteilung des durch die Variabilität zwischen den Tieren bedingten unterschiedlichen Verhaltens der Tiere herangezogen werden. Hierzu wäre eine Versuchsanordnung mit homogenen Tierstämmen notwendig, die sich jedoch, da solche Stämme z.Zt. in Deutschland kaum zur Verfügung stehen, nicht durchführen läßt. Zur Schätzung dieser biologischen Variabilität im Verhalten der Tiere benutzten wir die Abweichungen der Meßergebnisse von den Werten, die auf Grund unseres linearen Modelles zu erwarten waren. Diese biologische Variabilität ergibt sich in den Varianz-Analysen als die Wechselwirkung zwischen "Tieren und Zeiten". Es sei vermerkt, daß diese Wechselwirkung, also unsere Schätzung der biologischen Variabilität zwischen den Tieren, in jedem Falle wesentlich größer ist als der experimentelle Fehler. Die Genauigkeit der experimentellen Methode ist somit für die vorliegenden biologischen Gegebenheiten vollkommen ausreichend. Im einzelnen sind die Ergebnisse der Varianz-Analysen wie folgt zu interpretieren:

a) Farbstoff-Quaddel

Die Varianz zwischen den Zeiten bringt die Variabilität der Farbstoffquaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen zum Ausdruck. Mittels des F-Testes wurde geprüft, ob diese Variabilität wesentlich größer ist, als die Wechselwirkungen zwischen Tieren und Zeiten. Die Hierbei ermittelten Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$, die sich in den entsprechenden Tabellen finden, überschreiten in keinem Falle die 5 %-Sicherheitsgrenze der zugehörigen F-Verteilung. Es ist daher berechtigt,

anzunehmen, daß die Änderungen der Farbstoffquaddeln während des gesamten Versuchsverlaufes zufälliger und nicht systematischer Natur sind. Ein Einfluß der Medikation auf die Ausbreitung der Farbstoff-Quaddel ist somit nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis gilt für beide Versuchsgruppen.

b) Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der "Wechselwirkung Tiere - Zeiten" zeigt bei beiden Tiergruppen an, daß die Abweichungen unter den verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddeln nicht mehr als zufällig angesehen werden können. Da die Kontrollversuche gezeigt haben, daß die Ausbreitung der Farbstoff + Hyaluronidas-Quaddel ohne Medikation auch über einen längeren Zeitraum hinweg konstant bleibt, kann es für die vorliegenden Versuche als statistisch gesichert angesehen werden, daß die Medikation auf die Ausbreitung der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel einen Einfluß hat. (Irrtumswahrscheinlichkeit für diese Aussage höchstens 0,1 % bzw. 2,0 %, S. Tab. 6 und 7).

Für welche Zeitpunkte speziell eine Hemmung der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel vorlag, prüften wir im Anschluß an die Varianz-Analysen, nach dem von DUNCAN hierfür entwickelten Test. Das Ergebnis dieser Prüfungen ist in den Tabellen 8 und 9 angegeben.

In den Tabellen 8 und 9 sind für jeden Zeitpunkt die Mittelwerte $\bar{x}$ der Farbstoff- sowie der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel aller Tiere angegeben, außerdem die Varianz s^2 zwischen

den zu einer Doppelbestimmung gehörigen Einzelbestimmungen und der sich daraus ergebende mittlere Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes einer Doppelbestimmung. In der Spalte H_{eM} ist die prozentuale, mittlere Hyaluronidashemmung der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddeln aufgeführt und in der Spalte "Sicherung" vermerkt, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit diese Hemmung als ein Effekt der Medikation anzusehen ist.

Farbstoff - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	10	4.070	407	-	-
Zwischen den Zeiten	2	166	83	-	-
Tiere - Zeiten	20	6.253	313		
Zwischen Doppelbest.	32	10.489	328		
Innerhalb Doppelbest.	33	1.897	57		
Gesamt-Varianz	65	12.386	191		

Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	10	5.051	505	-	-
Zwischen den Zeiten	2	30.629	15.314	20*36	0*1 %
Tiere - Zeiten	20	15.041	752		
Zwischen Doppelbest.	32	50.721	1.585		
Innerhalb Doppelbest.	33	3.710	112		
Gesamt-Varianz	65	54.431	837		

Tabelle 6

(Versuchsreihe 2)

Farbstoff - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	5	2.934	587	-	-
Zwischen den Zeiten	2	461	230	-	-
Tiere - Zeiten	10	2.346	235		
Zwischen Doppelbest.	17	5.741	338		
Innerhalb Doppelbest.	18	1.299	72		
Gesamt-Varianz	35	7.040	201		

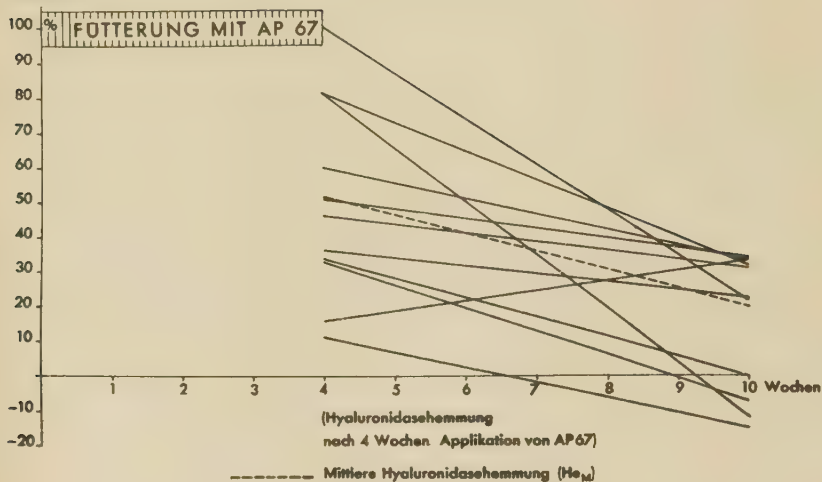
Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	5	4.254	851	-	-
Zwischen den Zeiten	2	9.787	4.893	6.53	2 %
Tiere - Zeiten	10	7.486	749		
Zwischen Doppelbest.	17	21.527	1.266		
Innerhalb Doppelbest.	18	3.238	180		
Gesamt-Varianz	35	24.765	708		

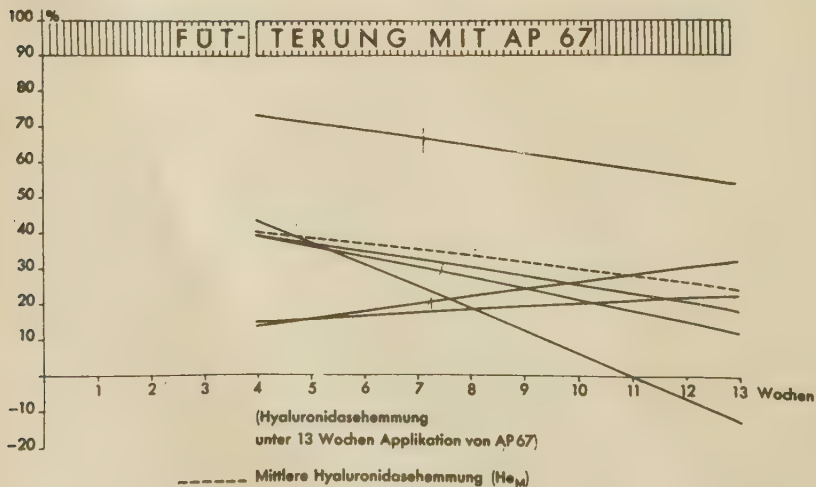
Tabelle 7

(Versuchsreihe 3)

HYALURONIDASE HEMMUNG



HYALURONIDASE HEMMUNG



	N	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	He_M	Sicherung
F_0	II	135	76,4	6,18		
FH_0	II	236	105,0	7,24		
F_1	II	132	55,0	5,24		
FH_1	II	184	116,0	7,61	51,5 %	0,1 %
F_2	II	136	41,0	4,53		
FH_2	II	216	116,3	7,63	19,3 %	0,1 %

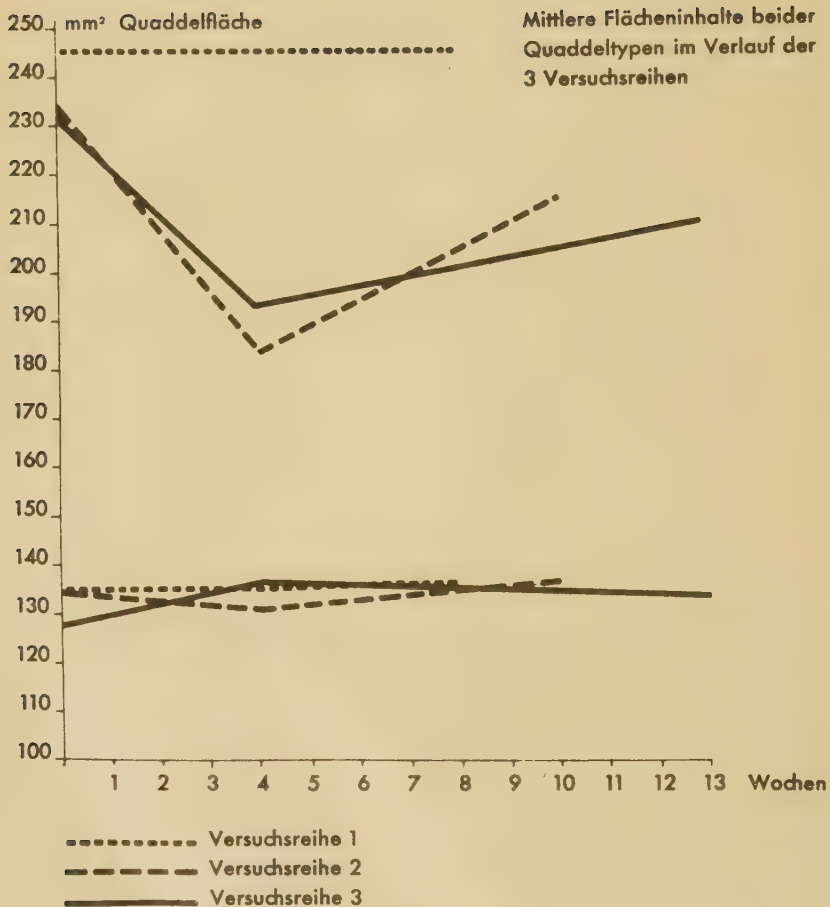
Tabelle 8

(Versuchsreihe 2)

	N	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	He_M	Sicherung
F_0	6	128	94,2	6,86		
FH_{M0}	6	233	164,8	9,08		
F_1	6	137	36,0	4,24		
FH_1	6	193	167,2	9,14	40,2 %	0,1 %
F_2	6	134	86,5	6,57		
FH_2	6	209	207,8	10,20	24,4 %	2,0 %

Tabelle 9

(Versuchsreihe 3)



Bei der Ermittlung des experimentellen Fehlers wurde angenommen, daß die Varianz zwischen den Einzelwerten einer Doppelbestimmung unabhängig vom Versuchsablauf sei. Eine Prüfung der in Tabelle 8 und 9 angegebenen Varianzen s^2 mittels des BARTLETT-Tests, ergab die nachstehenden χ^2 -Quadrat-Werte, mit den Freiheitsgraden n und einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von höchstens $p\%$:

Farbstoff-Quaddel	n	χ^2_{emp}	p
Gruppe 2	2	1,026	50 %
Gruppe 3	2	1,495	30 %

Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel	n	$\chi^2_{\text{emp.}}$	p
Gruppe 2	2	0,056	95 %
Gruppe 3	2	1,056	30 %

Die Annahme eines konstanten experimentellen Fehlers während des gesamten Versuches ist demnach mit den empirischen Ergebnissen verträglich.

Diskussion

Die Untersuchungen der Versuchsreihe 2 zeigen, daß ein Tag nach 4-wöchiger, täglicher, peroraler Applikation von Chloräthylbenzmethoxazin wie im Kurzversuch eine starke Hyaluronidasehemmung nachweisbar ist, die nach weiteren 6 applikationsfreien Wochen erheblich, aber auf einen statistisch noch faßbaren Wert sinkt. Dieses Ergebnis bedeutet, daß nach längerer Gabe eine zwar abklingende, aber doch nicht unerhebliche Hemmung über mehrere Wochen besteht.

Ein Einfluß des Gewichtes auf die Quaddelgröße scheint nach unseren Versuchen nicht zu bestehen, da die Werte im Leerversuch trotz Gewichtszunahme konstant blieben. Die zwangsläufige Zunahme während der Versuchsdauer dürfte also die Versuchsergebnisse nicht beeinflussen.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 3 zeigen vor allem das auffallende Phänomen, daß bei Fütterung über 4 Wochen hinaus - in diesem Fall über 13 Wochen - die nach 4 Wochen bestehende Hyaluronidasehemmung deutlich abnimmt. Der Endwert dieser Versuchsreihe war allerdings statistisch ebenfalls noch zu sichern. Das Ergebnis läßt aber den Schluß zu, daß sich die hyaluronidasehemmende Wirkung des Chloraethylbenz-methoxazons bei länger dauernder Gabe erschöpft, wobei zeitliche Vergleiche mit den therapeutischen Gegebenheiten beim Menschen natürlich nicht zulässig sind. Es muß jedoch auch beim Menschen damit gerechnet werden, daß eine zeitliche Begrenzung der Applikation mit Wiederholung in bestimmten Abständen für eine optimale Wirkung notwendig ist. Hinsichtlich dieser Aussage scheinen aber noch einige Überlegungen notwendig. Einmal zeigen die genannten Ergebnisse der Versuchsreihe 3, daß zwei der sechs Versuchstiere, die allerdings in ihren Ausgangswerten relativ niedrig lagen, unmittelbar nach Absetzen der 13-wöchigen Behandlung noch eine geringe Steigerung der hyaluronidasehemmenden Wirkung erkennen ließen (Abb. 2). Es muß also damit gerechnet werden, daß der zeitliche Ablauf der Reaktion von Tier zu Tier unterschiedlich ist. Weiterhin haben noch nicht veröffentlichte Arbeiten von VOGEL⁷⁾ und WEIS⁸⁾ mit hyaluronidasehemmenden Substanzen am

Menschen ergeben, daß die Werte der Hyaluronidasehemmung im Sinne eines Regulationsverhaltens in Schwankungen verläuft, die in Frequenz und Amplitude individuell sehr verschieden sein können, so daß sich entsprechende Mittelwerte verschiedener Versuchspersonen über den meist gleichartig verlaufenden Anfangseffekt hinaus schwer zu erhalten sind. Hier können nur Verläufe in kurzzeitigen Messungen am gleichen Individuum zu brauchbaren Ergebnissen führen. Es ist also durchaus möglich, daß ein Individuum zu einem bestimmten Zeitpunkt eine geringere Hyaluronidasehemmung zeigt, obwohl kurze Zeit später wieder ein höherer Wert gemessen wird. Versuche von MATHIES und Mitarb.⁹⁻¹²⁾ ließen auch schon im Tierversuch erkennen, daß diese Schwankungen vermutlich auch während der Nachwirkung einer hyaluronidasehemmenden Substanz vorhanden sind. Diese Vermutung wird durch den Nachweis erhärtet, daß eine Hyaluronidasehemmung bei Applikation entsprechend wirksamer Stoffe durch schubweise Katecholaminausschüttung des Nebennierenmarkes zustande kommt¹³⁻¹⁷⁾ und nicht bei einer laufenden Erhöhung des Blutadrenalinpiegels auftritt¹⁸⁾. Andererseits konnte gezeigt werden, daß auch nach Gabe hyaluronidasehemmender Stoffe über längere Zeit hinweg dieser Katecholamineffekt noch wirksam ist, da z.B. nach Moorbädern¹⁹⁾ und Chlorognin-Gaben²⁰⁾ die hyaluronidasehemmende Nachwirkung durch Ergotamintartrat blockiert werden kann.

Diese Überlegungen bedeuten, daß zunächst das Nachlassen der hyaluronidasehemmenden Wirkung, das in den vorgelegten Versuchen gezeigt wurde, nur bedingt verwertbar ist, da in Rattenversuchen kurzfristige Kontrollen und eine Verfolgung der Abläufe des einzelnen Individuums wegen der geringen Ausdehnung der Bauchhaut nicht möglich ist.

Damit haben die vorgelegten Untersuchungen zum Zweck, die Anregung zu geben, eine mögliche Erschöpfung der hyaluronidasehemmenden Wirkung bei längerer Gabe hyaluronidasehemmender Substanzen am Menschen zu objektivieren.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 2 zeigen eindeutig, daß bei längerer Gabe von Chloräthylbenzmethoxazon eine über lange Zeit anhaltende hyaluronidasehemmende Wirkung besteht.

Zusammenfassung

In den vorgelegten Versuchen wurde am Beispiel des 2-(β -Chloräthyl)-2,3-dihydro-4-oxo-(benzo-1,3-oxazin) gezeigt, daß nach längerer peroraler Verabreichung (4 Wochen) auch nach weiteren 6 applikationsfreien Wochen eine zwar geringere, aber noch nachweisbare hyaluronidasehemmende Wirkung besteht. Ferner kann vermutet werden, daß sich bei fortdauernder Applikation - in unserem Fall über 13 Wochen - die hyaluronidasehemmende Wirkung erschöpft. Auf Grund verschiedener Überlegungen können jedoch aus diesem Ergebnis, das in Rattenversuchen gewonnen wurde, noch keine bindenden Schlüsse gezogen werden. Weitere Verlaufsversuche an immer demselben Individuum, zu denen sich am besten der Mensch eignet, werden angeregt. Es wird diskutiert, ob bei zeitlicher Begrenzung der Chloräthylbenzmethoxazon-Gabe mit Wiederholung in bestimmten Abständen ein optimaler hyaluronidasehemmender Effekt zu erzielen ist.

Literaturverzeichnis

- | | |
|---|--|
| 1. Mathies, H. und
v. Werther, G. | im Manuskript |
| 2. Gerson, U. | Diss. München in Vorb. |
| 3. Beisenherz, G., Ohnacker, G.,
Ackermann, A. u. Kaiser, A. | Arzneim.-Forsch. <u>7</u> , 633
(1957) |
| 4. Wilhelmi, G.
zit. Domenjoz, R. | Arch.exper.Path.u.Pharmakol.
<u>225</u> , (1955), 14 |
| 5. Madinaveitia, J. | Biochem.J. <u>32</u> (1938) 1806 |
| 6. Gibian, H. | Ergeb.d.Enzymforsch. <u>13</u> (1954), I |
| 7. Vogel, M. | Diss. München in Vorb. |
| 8. Weiß, G. | Diss. München in Vorb. |
| 9. Mathies, H. | in Vorb. |
| 10. Mathies, H. und
v. Werther, G. | Zschr.f.angew.Bäder-Klimak.
<u>2</u> , 503-515 (1958) |
| 11. Rösch, U. | Diss. München in Vorb. |
| 12. Esper, U. | Diss. München in Vorb. |
| 13. Mathies, H. | Zschr.Rheumaforsch. <u>17</u> (1958) 375 |
| 14. Mathies, H. und
v. Werther, G. | Zschr.angew.Bäder-Klimak.
im Druck |
| 15. v. Werther, G. | Diss. München 1958 |
| 16. Hartmann, M. | Diss. München in Vorbereitung |
| 17. Schub, T. | Diss. München in Vorbereitung |
| 18. Schlierf, G. | Diss. München in Vorbereitung |
| 19. Haupt, E. | Diss. München in Vorbereitung |
| 20. Fumy, A. | Diss. München in Vorbereitung |

Ich möchte Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und der Firma Dr. Karl Thomae, Biberach/Riß, für die Bereitstellung der Versuchsmengen danken.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für alle Hilfe bei ihrer Durchführung.

Herrn Diplom-Mathematiker K.G. Liebrich danke ich für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse.

Lebenslauf

Ich wurde am 17. Mai 1935 als fünftes Kind des prakt. Arztes, Dr. med. Robert Schwank, und seiner Frau, Dr. med. Toni-Louise Schwank, geb. Daeuwel, in Karlsruhe geboren. Ich besuchte von 1941-1945 die Volksschule in Karlsruhe und in Bad Dürkheim, ab 1946 das Lessingrealgymnasium in Karlsruhe, graduierte 1952 an der Academy of Notre Dame, Belleville, Illinois, U.S.A. und machte 1954 in Karlsruhe am Lessingrealgymnasium das Abitur.

Danach begann ich in Heidelberg mein Medizinstudium und legte dort nach dem Sommersemester 1956 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach meinem Studium an der freien Universität Berlin kam ich nach München, wurde im November 1957 an der Ludwig-Maximilian-Universität immatrikuliert und begann im März 1958 mit den Experimenten zu der vorgelegten Arbeit.

